

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI HERBISIDA DIURON DAN BROMACIL DARI AREA PERKEBUNAN DI LAMPUNG

Nur Laili dan Hartati Imamuddin

Kawasan CSC, Jl Raya Jakarta-Bogor Km 46 Cibinong 16911

E-mail: lie_azzahra@yahoo.co.id

ABSTRACT

Diuron and bromacil are a broad-spectrum herbicide that is widely used in some plantation at Lampung. The soil sample is collected from some locations such as at banana Plantation (NTF), pineapple plantation (GGPC) and sugarcase plantation (GM). The aims of the research was to know the isolation and characterization of diuron and bromacil degrading bacteria. The highest diuron resistant bacteria was found in GM soil sample and The highest bromacil resistant bacteria was found in NTF soil sample. The result showed that there are three isolates for diuron degradation and five isolates for bromacil degradation bacteria from NTF, GGPC and GM. These isolates were tested to explore their ability for diuron and bromacil degradation on different concentrations. Isolation of bacteria was tested by using enrichment culture method and degradation of diuron and bromacil were checked by using spectrophotometric method. Diuron and bromacil degradation by 5 consortium indicated that all of consorsia have the ability to degrade them.

Key words: bacteria, bromacil, characerization, diuron, isolation

PENGANTAR

Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] adalah herbisida yang memiliki spektrum yang luas sebagai pembasmi hama tanaman yang berupa rumput atau semak dan dapat juga menghambat germinasi biji. Diuron adalah herbisida yang memiliki gugus phenylurea yang digunakan secara luas untuk mengontrol hama rumput pada perkebunan (Turnbull *et al.*, 2001). Bromacil (5-bromo-3-sec-butyl-6-methyluracil) merupakan herbisida yang juga digunakan secara luas di perkebunan. Diuron dan bromacil digunakan secara luas di beberapa perkebunan di Lampung, antara lain: perkebunan pisang (NTF), perkebunan nanas (GGPC) dan perkebunan tebu (GM). Penggunaan diuron dan bromacil di perkebunan NTF dan GGPC lebih tinggi dibandingkan di perkebunan GM, karena manajemen GM sudah mulai menggunakan kompos dan pupuk organik untuk perkebunan tebunya. Penggunaan herbisida ini yang berulang kali akan menyebabkan akumulasi diuron dan bromacil di tanah dan menyebabkan menurunnya kualitas tanah dan berdampak juga pada turunnya populasi dan diversitas mikroorganisme tanah di perkebunan ini. Namun, ada beberapa mikroorganisme tanah yang memiliki kemampuan mendegradasi herbisida yang terakumulasi di tanah.

Diuron merupakan salah satu herbisida phenylurea yang mudah didegradasi oleh mikroorganisme tanah (Fratila-Apachitei, 1999). Turnbull *et al.* (2001) melaporkan bahwa yang bakteri dapat merombak diuron diisolasi dari tanah yang telah lama terkontaminasi diuron. Hal ini dikarenakan mikroorganisme yang telah lama kontak

dengan diuron dapat menghasilkan pola degradasi yang cepat dibandingkan dengan mikroba yang berasal dari tanah yang tidak terkontaminasi. Kemampuan degradasi diuron oleh bakteri ini dapat ditentukan dari aktivitas enzim yang dimiliki oleh bakteri tersebut dan juga stabilitas fenotip degradasinya (Turnbull *et al.*, 2001). Degradasi diuron dimulai dengan hilangnya gugus N-methyl yang berakibat pada penurunan aktivitas diuron di tanah, kemudian diikuti dengan hilangnya gugus urea, dan terbentuk 3,4-dichloroaniline dan CO₂ sebagai produk degradasi diuron (Dellamatrice and Monteiro, 2004).

Bromacil termasuk herbisida golongan uracil yang memiliki mobilitas tinggi dan relatif kurang dapat didegradasi dibandingkan dengan herbisida yang lain. Bromacil dapat persisten di tanah selama dua tahun dan penggunaannya yang lama dapat menyebabkan masalah pada tata guna lahan. Tetapi telah banyak dilaporkan bahwa keberadaan bromacil di tanah dapat didegradasi oleh mikroorganisme tanah (Chaudry and Cortez, 1988). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri dari tanah perkebunan yang telah lama terpapar oleh diuron dan bromacil serta menguji kemampuan degradasinya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pengambilan sampel tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan di 3 perkebunan di Lampung, yaitu NTF, Lampung Timur (05 03.000 S, 105 38.785 E); GGPC, Lampung Tengah (04 49.512 S, 105 65.018 E) dan GM, Lampung Tengah (04 42.294 S,

105 12.658 E). Jumlah sampel yang diperoleh adalah 33 sampel, yaitu 4 sampel tanah dari perkebunan pisang NTF, 17 sampel tanah dari perkebunan nanas dan 12 sampel tanah di perkebunan tebu GM. Sampel tanah diambil berdasarkan aplikasi pestisida, dampak pestisida pada tanah dan tanaman, dan daya guna lahan. Setiap sampel dari tiga perkebunan kemudian dikomposit dan diperoleh 3 sampel untuk digunakan dalam analisis degradasi diuron dan bromacil.

Isolasi bakteri resisten dan pendegrasi diuron dan bromacil

Sampel tanah komposit dari tiga perkebunan (NTF, GGPC dan GM)

Isolasi dilakukan untuk mendapatkan populasi bakteri umum dan resisten terhadap herbisida diuron dan bromacil. Isolasi dilakukan dengan metode enumerasi pada media NA untuk bakteri total, dan untuk isolasi bakteri yang resisten terhadap herbisida menggunakan media NA+100 ppm bromacil dan NA+50 ppm Diuron.

Isolasi bakteri pendegradasi diuron. Isolasi dilakukan dengan metode enrichment kultur yang bertujuan untuk mencari bakteri bersifat diuron degrader

Dilakukan dengan cara menimbang sampel tanah dari GGPC, NTF, dan GM sebanyak 10 g, dimasukkan kedalam media MM sebanyak 100 ml + 5 ppm Diuron (erlenmeyer 250 ml) dan dihomogenisasi di atas *rotary shaker* selama 15 menit, setelah itu dipipet 1 ml suspensi tanah tersebut dan diinokulasikan kedalam 20 ml media MM + 5 ppm diuron (erlenmeyer 100 ml), kemudian dihomogenisasi di atas *rotary shaker* selama 2 minggu, perlakuan ini diulang sampai 4 kali (4×2 minggu). Setelah 2 bulan, dilakukan isolasi dengan cara menambahkan 0,1% Tween 80 dan dihomogenkan dengan vortex, kemudian dipipet 20 μ l dan disapukan dengan spatula steril ke media padat NA. Isolat yang didapat digunakan untuk pengujian pertumbuhan dan degradasi.

Isolasi bakteri pendegradasi bromacil

Isolasi dilakukan dengan metode *enrichment* kultur. Isolasi dilakukan dengan cara dengan menimbang 10 g sampel tanah dari Lampung kemudian dimasukkan ke dalam 50 ml media *Mineral Salt Medium* (MSM) + 500 ppm bromacil dalam erlenmeyer 250 ml dan selanjutnya suspensi dihomogenisasi di atas *rotary shaker* pada suhu kamar ($\pm 28^\circ \text{C}$) selama 8 minggu. Pengambilan sampel untuk perhitungan bakteri dilakukan pada hari ke-0, minggu ke-2, 4, dan ke-8.

Pertumbuhan dan degradasi diuron oleh isolat bakteri dari Lampung

Isolat yang didapat dari isolasi *diuron degrader* dimurnikan dan isolat yang telah murni diujikan lagi ke media MM + 10 ppm Diuron untuk mengetahui kemampuan isolat tersebut dalam menggunakan Diuron sebagai sumber Karbon. Selain itu juga ditumbuhkan isolat hasil *plate count* (NA + diuron 10 ppm) sebagai pembanding.

Lima konsorsia bakteri asal Lampung diukur laju pertumbuhan dan uji degradasi untuk diuron. Konsentrasi Diuron yang digunakan adalah 50 ppm. Parameter yang diamati adalah pertumbuhan dan penurunan konsentrasi diuron selama 6 hari. Sebelum dilakukan pengujian dicari OD optimal untuk diuron yang akan digunakan untuk pembuatan kurva standar diuron dan diperoleh OD optimal untuk diuron adalah 314 nm.

Pertumbuhan dan degradasi bromacil oleh isolat bakteri dari Lampung

Lima isolat (NTF 1, NTF 2, GM 1, GM 2 dan GM 3) yang telah murni diujikan ke media MM + 50 ppm bromacil untuk mengetahui kemampuan isolat tersebut dalam mendegradasi bromacil.

Lima konsorsia asal Lampung diukur laju pertumbuhan dan degradasinya. Konsentrasi bromacil yang digunakan adalah 50 ppm. Parameter yang diamati adalah pertumbuhan dan penurunan konsentrasi bromacil selama 6 hari. Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dicari OD optimal untuk bromacil yang akan digunakan untuk pembuatan kurva standard bromacyl dan diperoleh OD optimal untuk degradasi bromacil adalah 277 nm.

HASIL

Isolasi Bakteri

Hasil isolasi bakteri total, bakteri pendegradasi diuron dan bromacil dari 3 perkebunan (NTF, GGPC, dan GM) di Lampung ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pertumbuhan isolat dari GGPC, NTF dan GM dalam media Diuron 10 ppm

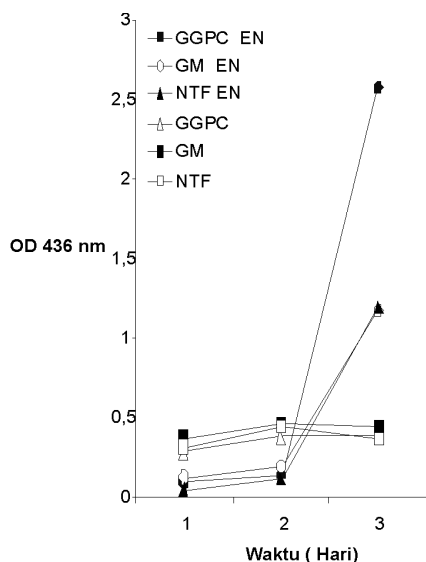
No.	Sampel	Populasi Bakteri (CFU/g tanah) $\times 10^4$		
		Total	Resisten diuron	Resisten Bromacil
1	GM	>300	381,25	63,75
2	NTF	3892,5	138,75	192,5
3	GGPC	38960	116,25	127,5

Keterangan: **EN** = hasil isolasi enrichment

Hasil isolasi bakteri menunjukkan jumlah populasi bakteri yang bervariasi dari ketiga perkebunan. Perkebunan tebu (GM) memiliki populasi bakteri resisten diuron paling tinggi, NTF mempunyai bakteri resisten bromacil paling tinggi, dan perkebunan nanas (GGPC) unggul pada populasi bakteri total.

Pertumbuhan bakteri resisten dan pendegradasi diuron

Hasil pengukuran pertumbuhan dari bakteri resisten Diuron ditunjukkan pada Gambar 1 dan Tabel 1.



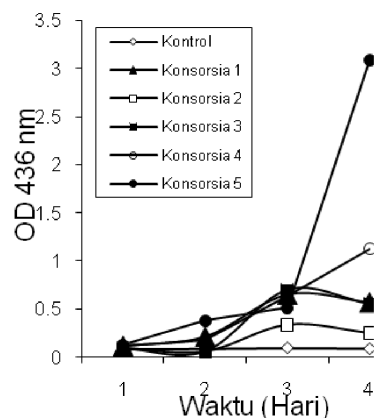
Gambar 1. Pertumbuhan isolat dari GGPC, NTF dan GM dalam media Diuron 10 ppm

Isolat hasil dari isolasi dengan metode *plate count* + diuron mempunyai pertumbuhan yang relatif rendah dibandingkan dengan pertumbuhan bakteri yang didapat dengan metode *enrichment* kultur.

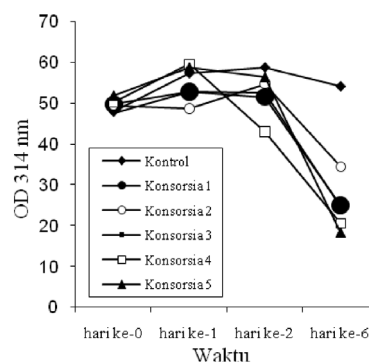
Hasil pertumbuhan konsorsia mikroba pada diuron 50 ppm ditunjukkan pada Gambar 2.

Uji degradasi diuron pada konsentrasi 50 ppm menggunakan 5 konsorsia mikroba yang berasal dari ketiga perkebunan menunjukkan hasil seperti yang ada di Gambar 3.

Pertumbuhan 5 konsorsia pada media MM + diuron 50 ppm menunjukkan pertumbuhan yang relatif bagus. Pertumbuhan paling bagus diperlihatkan oleh konsorsia 5, diikuti konsorsia 4, konsorsia 3 dan 1, konsorsia 2 dan kontrol (Gambar 2). Pada gambar 3 dapat dinyatakan bahwa 5 konsorsia memiliki kemampuan mendegradasi diuron dengan tingkat kemampuan yang berbeda.



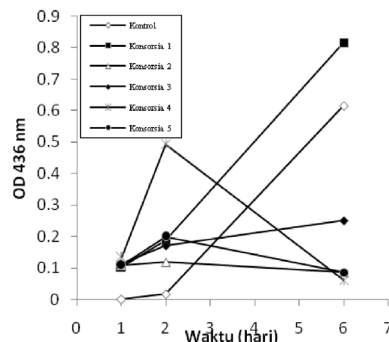
Gambar 2. Pertumbuhan 5 konsorsia bakteri pada diuron 50 ppm



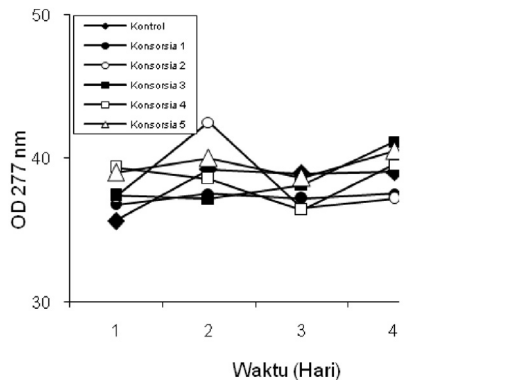
Gambar 3. Degradasi diuron 50 ppm oleh 5 konsorsia dari Lampung

Pertumbuhan bakteri resisten dan pendegradasi bromacil

Hasil uji pertumbuhan mikroba dan degradasi bromacil menggunakan 5 konsorsia mikroba ditunjukkan pada Gambar 4 dan Gambar 5.



Gambar 4. Pertumbuhan 5 konsorsia bakteri pada bromacil 50 ppm

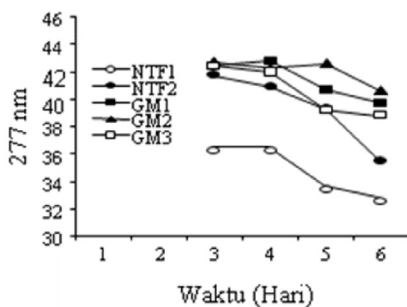


Gambar 5. Degradasi 5 konsorsia bakteri pada bromacil 50 ppm

Pertumbuhan 5 konsorsia pada media yang mengandung bromacil (Gambar 4) pada hari ke-2 menunjukkan bahwa konsorsia 4 mengalami pertumbuhan paling cepat, diikuti oleh konsorsia 1, 3, 5 kemudian 2 dan kontrol. Pada akhir pengamatan, konsorsia 1 memiliki OD paling besar ($>0,8$), diikuti oleh kontrol (OD = 0,6), konsorsia 3 (OD = 0,2) dan 3 konsorsia mempunyai OD yang sama ($<0,1$).

Degradasi bromacil oleh 5 konsorsia (Gambar 5) menunjukkan kemampuan degradasi yang masih belum stabil dan masih terlalu kecil.

Uji degradasi bromacil 50 ppm juga menggunakan 5 isolat yang diperoleh dari hasil isolasi. Hasil uji degradasi ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Degradasi bromacil 50 ppm dari isolat bakteri NTF dan GM

Dari Gambar 6 dapat dikatakan bahwa persentase penurunan konsentrasi Bromacil masih relatif kecil, penurunan terbesar didapatkan pada isolat NTF-1 dengan penurunan sebesar 34,8%, diikuti oleh isolat NTF-2 sebesar 29,1%, GM-3 sebesar 22,4%, GM-1 sebesar 21,3%, dan GM-2 sebesar 18,7%.

PEMBAHASAN

Isolasi bakteri resisten dan pendegradasi diuron dan bromacil

Hasil isolasi bakteri menunjukkan bahwa dari ketiga perkebunan (GM, GGPC, dan NTF) mempunyai hasil yang berbeda baik untuk bakteri total dan resisten. Ini mengindikasikan bahwa penggunaan herbisida untuk setiap perkebunan berbeda dan mengakibatkan adanya perbedaan sifat biologi dan kimia tanah dari ketiga perkebunan tersebut.

Pada umumnya tanah yang sudah terpapar diuron terlalu lama akan berdampak menaikkan populasi bakteri yang resisten dan menurunkan populasi bakteri total. Hasil ini sesuai dengan percobaan Wardle and Parkinson (1992) yang hasilnya menunjukkan bahwa herbisida dapat menurunkan biomasa mikroba setelah aplikasi dengan herbisida.

Pertumbuhan bakteri resisten dan pendegradasi diuron

Metode isolasi resisten *enrichment* kultur ternyata memiliki kemampuan untuk tumbuh lebih baik hampir 10 kali lipat dibandingkan dengan metoda isolasi resiten media padat. Hal ini membuktikan bahwa pemberian herbisida (bromacil dan diuron) pada media yang terus menerus dalam waktu lama akan menyebabkan bakteri beradaptasi dengan lingkungan yang toksik dan memiliki resistensi terhadap diuron. Dengan demikian metode isolasi *enrichment* kultur akan menghasilkan isolat bakteri yang memiliki kemampuan tumbuh yang lebih baik karena mampu memanfaatkan diuron sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya (Gambar 1).

Pada Gambar 3 dapat dinyatakan bahwa 5 konsorsia bakteri mampu mendegradasi diuron dengan kemampuan yang berbeda. Degradasi diuron oleh konsorsia bakteri menunjukkan hasil yang bagus karena semua konsorsia mampu menurunkan konsentrasi diuron pada hari keenam. Hal ini karena pada konsorsia terdapat lebih dari satu spesies bakteri yang kemungkinan memiliki kemampuan dalam mendegradasi diuron. Konsorsia 4 merupakan konsorsia bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi diuron paling baik karena mampu menurunkan konsentrasi diuron pada hari kedua dan keenam dengan pola degradasi paling tinggi dibandingkan konsorsia yang lain. Degradasi diuron dari kelima konsorsia memiliki pola yang sama, yaitu diuron menurun secara kontinyu pada hari kedua sampai pada akhir pengamatan (hari keenam).

Pertumbuhan bakteri resisten dan pendegradasi bromacil

Pertumbuhan konsorsia bakteri pada bromacil menunjukkan bahwa beberapa isolat mengalami pertumbuhan yang lambat. Hasil uji degradasi juga menunjukkan kemampuan degradasi yang relatif kecil dan tidak stabil. Hal ini dapat dikorelasikan dengan sifat bromacil yang memiliki persistensi yang lama di tanah dan merupakan salah satu jenis herbisida yang sulit didegradasi. Rendahnya aktivitas degradasi bromacil oleh bakteri juga dapat diakibatkan karena adanya penambahan nutrisi, seperti adanya sumber karbon, nitrogen, potassium dan fosfor di dalam media. Hal ini menyebabkan bakteri tidak akan menggunakan bromacil sebagai sumber nutrisinya sehingga proses perombakan bromacil tidak terjadi.

Berdasarkan hasil uji degradasi bromacil oleh isolat-isolat bakteri, diperoleh hasil bahwa isolat-isolat bakteri dari perkebunan NTF (29-34%), yaitu NTF-1 dan NTF-2 persentase kemampuan degradasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat-isolat dari perkebunan GM (18-22%). Hal ini menunjukkan adanya perbandingan lurus antara aktivitas degradasi dengan jumlah bakteri resisten bromacil yang diperoleh dari hasil isolasi, di mana NTF memiliki populasi bakteri pendegradasi bromacil tertinggi. Hasil yang didapat pada penelitian ini sangat kecil bila dibandingkan dengan hasil penelitian Chaudhry (1988), yang melaporkan bahwa dari 50 ppm pestisida

yang dicoba habis dalam 1 minggu. Degradasi pestisida sangat dipengaruhi adanya struktur pestisida secara fisik dan kimia hal inilah yang mungkin terjadi pada degradasi bromasil dengan gugus cincin phenyl yang berpengaruh pada kemampuan degradasi dan group polar, gugus OH, COOH dan NH₂ membuat senyawa tersebut susah untuk dirombak oleh mikroba (Chowdhury *et al*, 2008).

KEPUSTAKAAN

- Chaudry GR and Cortez L, 1988. Degradation of bromacil by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2203–2207.
- Chowdhry AS, Pradhan, M Saha, N Sanyal, 2008. Impact of pesti cides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategis. *Indian J. Microbiol* 48: 114–127.
- Dellamatrice PM and Monteiro RTR, 2004. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. *Brazilian Archives of Biology and Biotechnology* 47: 999–1003.
- Fratila-Apachitei LE, Hirst JA, Siebel, MA, and Gijzen HJ, 1999. Diuron degradation by *Phanerochaeta chrysosporium* BKM-F-1767 in shyntetic and natural media. *Biotechnology Letters* 21: 147–154.
- Turnbull GA, Cullington JE, Walker A, and Morgan JAW, 2001. Identification and characterisation of diuron-degrading bacteria. *Biol Fertil Soils* 33: 472–476.
- Wardle DA and Parkinson, 1992. Influence of the herbicides 2,4-D and glyphosate on soil microbial biomass and activity: a field experiment. *Soil Biol. Biochem* 24: 185–186.